

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-250506

(P2003-250506A)

(43) 公開日 平成15年9月9日 (2003.9.9)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
A 2 3 L	3/42	A 2 3 L	3 L 1 1 3
	3/44		4 B 0 2 2
A 6 1 K	9/19	A 6 1 K	4 C 0 7 6
	47/42		
F 2 6 B	5/06	F 2 6 B	
		審査請求 未請求 請求項の数 8	OL (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願2002-57939 (P2002-57939)

(22) 出願日 平成14年3月4日 (2002.3.4)

(71) 出願人 000210067

池田食研株式会社

広島県福山市箕沖町95番地7

(72) 発明者 小幡 斉

兵庫県尼崎市武庫之荘6丁目3番5号

(72) 発明者 河原 秀久

大阪府枚方市長尾元町7丁目11番34号

(72) 発明者 小村 啓悟

広島県福山市箕沖町95番地7 池田食研株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 凍結乾燥方法

(57) 【要約】

【解決手段】 不凍蛋白質を含有してなる物質の凍結乾燥方法、および得られた凍結乾燥物を提供する。

【効果】 本発明において不凍活性蛋白を使用することで、凍結乾燥処理により得られる凍結乾燥物は、凍結乾燥後の色調、風味、栄養分あるいは生理活性成分などが保持されたままであり、かつ乾燥による嵩の減少防止がなされ、さらには品質の劣化や、形状の崩壊や吸湿などの防止が図れる。すなわち、本発明の不凍蛋白質活性を内在させる被乾燥物は、食品、植物、薬品、蛋白質、細胞などを含んでおり、食品に限らず、生化学あるいは医学的意義が存在する分野、例えば治療薬、補充療法薬の分野において広く利用可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】不凍蛋白質を含有してなることを特徴とする被乾燥物の凍結乾燥方法。

【請求項 2】被乾燥物に不凍蛋白質を内在させる工程を実施した後、該物質を凍結乾燥することを特徴とする被乾燥物の凍結乾燥方法。

【請求項 3】被乾燥物が少なくとも食品、植物、薬品、蛋白質または細胞であることを特徴とする請求項 1～2 いずれか 1 項記載の被乾燥物の凍結乾燥方法。

【請求項 4】不凍蛋白質が、少なくとも植物、魚、昆虫または微生物由来である、請求項 1～3 いずれか 1 項記載の被乾燥物の凍結乾燥方法。

【請求項 5】不凍蛋白質を含有してなることを特徴とする凍結乾燥物。

【請求項 6】不凍蛋白質を含有してなることを特徴とする凍結乾燥食品。

【請求項 7】水分含量が 15% 以下であることを特徴とする請求項 5～6 のいずれか 1 項記載の凍結乾燥物。

【請求項 8】不凍蛋白質を含有してなることを特徴とする凍結乾燥用保護剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、凍結乾燥方法に関し、不凍蛋白質を含有してなる被乾燥物の凍結乾燥方法、および得られる凍結乾燥物に関する。また、食品、植物ならびに細胞などに不凍蛋白質を内在させた後、凍結乾燥する方法の提供に関する。さらに、不凍蛋白質を含有し有効成分とする凍結乾燥用保護剤に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、野菜や水産物、畜肉などの食品を、色や風味、栄養分を極力劣化させずに保存したり、生薬などの薬品あるいは生細胞を、薬理成分、生体成分の喪失や破壊を避けつつ保存するための有力な方法として、凍結乾燥技術が使用されている。凍結乾燥は、熱をかけずに乾燥させるため色や風味、味質、栄養分あるいは生理活性成分などが保持される上、乾燥によって嵩が減らないため見栄えもよいという特長を持っており、様々な利用がなされている。しかし、通常、凍結乾燥に供す前にあらかじめ凍結させる段階で生じた氷結晶は、凍結中や保存中あるいは凍結乾燥中に成長し、凍結乾燥品の組織に氷結晶大の破壊を招く。このことが凍結乾燥品の硬さの低下、もろさ、見栄えの悪さを引き起こし、処理前に比べて本来の性状を留めず、期待される効果が得られていないのが現状である。これを防止する目的で、グルコースやシュクロース、グリセロール、トレハロースなどの糖類を添加する方法が用いられていた。しかし、これらの方法でも凍結乾燥品の品質は充分とは言えず、大量に添加することによる甘味の増加や、凍結乾燥中の発泡、凍結乾燥後の空気中の水分を吸湿して、凍結乾燥物の品質や機能の劣化につながり、実際に使用する

ことはほとんど不可能であり、大きな問題となっている。

【0003】植物や魚類、昆虫などが産生する不凍蛋白質複合体として「不凍活性物質」が知られている。この不凍蛋白質は、氷の結晶表面を認識し、氷結晶表面に吸着し氷結晶の成長を抑制し、すなわち凍結保存や解凍中の氷の再結晶化を極力防止する。また、水の凍結点の低下作用を有することが知られている蛋白質である。そのため不凍蛋白質は、霜害防除、冷凍食品の品質向上、細胞や組織の保存、低温手術での利用などにおける有用性が指摘され、アイスクリームなどの氷菓子への添加（米国特許第 472500 号）報告、冷凍保存する食肉にあらかじめ浸漬するなどの応用が期待されている。これらは、冷凍する際に生じる氷結晶の成長から奏される舌触りの改良や、解凍後に生じるドリップの発生を抑える効果を持っているとされている。しかし、この不凍蛋白質を凍結乾燥品に利用し、新しい食感などの効果を有した凍結乾燥物を得ることについてはこれまで知られていなかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上述の従来技術における問題点に鑑みて検討されたもので、凍結乾燥において食品本来の味質や風味を損なうことなく、硬さや形状といった品質を保持することができる方法を提供するものである。本発明はまた、冷凍処理による氷結晶の成長を抑制し、細胞膜、細胞壁など食品組織の破壊を防止すると共に、凍結乾燥後、良好なテクスチャーを有する新規な凍結乾燥品を提供することにより、食生活を豊かにすることを課題とするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、解決困難な上記課題を解決すべく、極めて有効でかつ効果的な被乾燥物の凍結乾燥方法を提供するため、鋭意研究を行った結果、不凍蛋白質に着目し、不凍蛋白質を含有し凍結乾燥することにより、効率よく、かつ品質を安定に、被乾燥物を乾燥しうる方法を見出した。本発明の不凍蛋白質を有効成分とした凍結乾燥用保護剤を用い凍結乾燥処理することで、品質が良好で、かつ新規な凍結乾燥物を提供可能であることをも見出した。

【0006】

本発明は、不凍蛋白質を含有してなる被乾燥物を凍結乾燥する方法に関し、得られた乾燥品についても提供可能である。すなわち、食品、植物、薬品、蛋白質、細胞などを含む被乾燥物に、不凍蛋白質を取り込ませたり、浸透させることなどで内在させた後、該被乾燥物を凍結乾燥処理する方法を提供し、さらには、得られた凍結乾燥物を提供することを特徴とする。本発明の凍結乾燥物は水分含量が 15% 以下であり、他方には不凍蛋白質を内在する被乾燥物を水分含量が 15% 以下まで乾燥することを特徴とする。また、本発明により、不凍蛋白質を有効成分として含有してなる凍結乾燥用保護

剤を提供可能である。

【0007】本発明の不凍蛋白質は、冷海水中で生息している魚、植物などに種々存在していることが知られており、相対分子量(Mr)が約3,300~140,000の不凍ポリペプチド(AFP)であり、Mrが約2,500~34,000の範囲の糖蛋白質(不凍糖蛋白質またはAFGP)をも含有する。Ananthanarayananら(Life Chemistry Reports 7:1-32 (1989))、DeVriesら(Ann.Rev.Physiol.45:245-260 (1983))、Daviesら(FASEB j.4:2460-2468)、Warrenら(米国特許第5118792号)により不凍蛋白質が述べられている。現在、数種類の異なる不凍蛋白質が様々な冷水魚から確認されている。例えば、AFP(I型)はアラニンに富み(α -ヘリックスポリペプチド)、カレイやカジカに存在している。AFP(II型)はハーフシスチンに富み、ケムシカジカ、ニシンやキュウリウオ科の魚に存在している。AFP(III型)は球状タンパク質がゲンゲやオオカミウオを含む数種のゾアルコイド科に存在している。南極魚と南北両極タラに見られる不凍糖蛋白質は、主に、トレオニル残基に結合した二糖を含むトリペプチド反復(Ala-Ala-Thr)からなっている。AFPとAFGPは構造上異なるが、氷表面に結合することにより氷晶増殖を阻止する能力が共通している。現在AFPとAFGPは血清から単離されており、そのDNA配列は肝臓からのcDNAクローニングにより推測されている。現在までに記載されたタンパク質の全ては、ポリペプチドの分泌の役割を示すシグナルペプチドを含む大きな前駆体ポリペプチドとして合成されている。本発明の不凍蛋白質は、AFP、AFGPを含有する抽出物であっても、それぞれに単離精製されたもの単独、もしくはそれらの混合物であってもよい。使用時に水溶性が求められる場合は、好ましくは水溶性の高いAFP(II型)あるいはAFP(III型)を使用するのがよい。本発明の不凍蛋白質は、少なくとも植物由来、魚由来、昆虫由来、微生物由来を使用し、1種単独もしくはそれらを組合せて使用しても良く、食品以外の用途で利用する植物に適用する場合であれば、遺伝子組み換え生物により生産された不凍蛋白質であってもよい。不凍蛋白質の製造方法は、生物から抽出、精製する通常の方法に順じて行えばよい。

【0008】本発明の不凍蛋白質の添加量は、適用する被乾燥物の形態、大きさ、種類、性質、凍結乾燥条件、浸漬条件、またこの不凍蛋白質を含有する凍結保護剤の成分などに応じて適宜の範囲として使用することができる。一般に乾燥固形分に換算して該重量の90%以下、好ましくは0.001~50%とする事ができる。例えば、食品(名称:馬鈴薯、大きさ:15×15×15mm)100重量%に対し10重量%以下である。好ましくは1重量%以下であり、より望ましくは0.0001~1.0重量%である。さらに、不凍蛋白質を含有して

なる凍結乾燥用保護剤は、少なくとも不凍蛋白質を含有し、該不凍蛋白質は上記の添加量から濃度を算出し使用すればよい。副成分としてプロテアーゼ活性の阻害物質を含有することが好ましい。プロテアーゼ活性を有する物質を含有する被乾燥物の凍結乾燥に用いる場合は、被乾燥物のプロテアーゼ活性を失活させた後、凍結乾燥してもよいし、該プロテアーゼの作用しないpHなどの条件で、不凍蛋白質を内在させ凍結乾燥してもよい。

【0009】本発明の凍結乾燥は、不凍蛋白質を内在させた被乾燥物を真空凍結による乾燥処理、冷凍後に加熱処理した乾燥処理、および冷凍後に脱水処理した乾燥処理などについても含有する。例えば、真空凍結乾燥方法による場合では、不凍蛋白質を内在した被乾燥物を凍結させ、約10 torr以下、好ましくは2~0.5 torrの減圧下で処理を行ない、気化により水分を除去すればよい。さらに、本発明の凍結乾燥に際しては、凍結しない温度もしくは凍結温度にて予備冷凍した後、凍結乾燥してもよい。真空凍結乾燥の方法および条件は、通常の方法や条件に従えば良く、特に限定されるものではない。例えば、被乾燥物を0~4℃で予備凍結させた後、氷点下の真空室(絶対圧力が例えば0.5 torr以下)内に封入して、品温45~50℃程度まで上昇させ、この温度でさらに120~180分乾燥する方法でもよい。さらに本発明の凍結乾燥は、冷凍した後に乾燥すばよく、冷凍後の乾燥方法は特に限定されるものではなく、天日乾燥、熱風または冷風乾燥、赤外線加熱乾燥など各種の方法を適用でき、乾燥時の雰囲気圧力も大気圧でも減圧下であってもよい。本発明の凍結乾燥方法を用いた被乾燥物中成分の抽出方法にも関する。本発明により得られる凍結乾燥物の水分含量は、15%以下、好ましくは10%以下、より好ましくは5%以下である。

【0010】また、本発明の食品、植物、薬品、蛋白質、細胞などについて説明する。本発明の物質とは、少なくとも食品、植物、薬品、蛋白質、細胞などを含有し、それらの一種単独もしくはそれらを組合せて使用しても良い。本発明において、該物質は凍結乾燥の被乾燥物、その中間加工物、またその最終製品である凍結乾燥物であって、本発明の不凍蛋白質、もしくは本発明の不凍蛋白質を含有する凍結乾燥用保護剤を含有するものである。本発明の食品は、本発明の不凍蛋白質を内在および含有などしてなる食品である。例えば、トマト、タマネギ、ニンジン、大根、ジャガイモ、ゴボウ、カボチャ、ピーマン、キャベツ、カリフラワー、アスパラガス、オクラ、ネギ、キュウリ、カボチャ、ナス、スイカ、ほうれん草、カリフラワーなどの野菜、豆などの穀物、イチゴ、柿、リンゴ、レモン、サクランボ、梨、桃、ブルーベリー、メロンなどなどの果物類、種実類、鮭、鯛、鰯、いか、えび、ほたてなどの魚介類、獣鳥肉類、卵類、乳類、きのこ類、藻類、菓子類、嗜好アルコールや茶などの嗜好飲料類、ソースなどの調味料類、香

香料類、また豆腐、こんにゃく、寒天などの加工品が挙げられ、またはこれらを煮沸調理などの加工、調理した食品も含まれる。また、本発明により得られる凍結乾燥食品は、水で戻して食してもよいし、水に戻さずそのまま喫食するスナック菓子のような形態でもよい。さらには、粉末の状態で食することもできる。さらに、この粉末を錠剤、糖衣錠、顆粒状に加工し、例えばパンおよびケーキ類、味噌、豆腐、キャンディー、ヨーグルト、ふりかけ、だしの素、スープの素、粉末醤油などの粉末調味料などの各種食品の原料中や、栄養保持食品として使用することもできる。本発明の食品の凍結乾燥方法は、不凍蛋白質を有効成分として上記の食品に含ませることに特徴を有している。その結果、良好な食感を持つ新規な凍結乾燥食品を提供可能である。

【0011】本発明の植物は、本発明の不凍蛋白質を内在、含有、および接触などしてなる植物である。例えば、穀物、野菜、花卉、果樹、果実などすべての植物、およびこれらの収穫物を意味する。また、植物には苗、種子も包含される。例えば、植物の苗や、カーネーション、デルフィニウム、スイートピー、カスミソウ、ユリ、フリージア、チューリップ、洋ラン、菊の花、桜の花、菜の花など、圃場で栽培した花卉類の植物、鉢に移植された花卉類の植物などすべての有用植物を挙げることができる。花卉類の植物茎の中間部や、下端部の所で根を切り離して作られる切り花、切り葉にも適用可能である。また、本発明の不凍蛋白質を用いた植物の凍結乾燥方法は、植物の鮮度を保持するための優れた方法に関するものである。本発明の不凍蛋白質を凍結保護剤として用いた植物の凍結乾燥方法は、植物を不凍蛋白質の含有する溶液に浸漬、噴霧、塗布など接触させ、あるいは不凍蛋白質の含有する沸騰溶液（pH 6～11）に浸漬、噴霧などブランチングを行なった後、再度不凍蛋白質を接触して凍結乾燥する。例えば、花卉を凍結乾燥する際には、花卉の表裏に不凍蛋白質を含有する沸騰溶液を噴霧後、または／および不凍蛋白質を含有する溶液に浸漬後凍結乾燥すればよい。本発明の植物の凍結乾燥方法は、不凍蛋白質を有効成分として上記の植物に施すことに特徴を有している。その結果、花類を長期に保存することができ、かつ、さらに収穫時の色調を保持し元来の新鮮な状態を維持することができ、甚だしい萎縮や変質を起すことはなく、市場に提供することができる。また、別法として、植物の栽培時に不凍蛋白質を施用し、収穫された植物をそのまま、もしくは不凍蛋白質を収穫された植物に内在せしめた後凍結乾燥すればよい。

【0012】本発明の薬品は、本発明の不凍蛋白質を内在、含有、および結合などしてなる薬品である。本発明の薬品は、医薬品、血液製剤、薬理活性蛋白および薬理活性ポリペプチド類などからなる蛋白質製品、実験材料、研究用試薬が挙げられる。本発明の薬品を製造するには、本発明の薬品および不凍蛋白質を適当量の水また

はリン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液などの緩衝液に溶解し、必要に応じて pH を不凍蛋白質の至適領域に調整し、無菌濾過する。濾液をバイアルまたはアンプルなどの容器に分注し、次いで常法により凍結乾燥した後、密栓または溶閉することにより本発明の製剤を含む薬品を製造することができる。また、上記の濾液を凍結乾燥し、得られる粉末を上記の容器に分注し、ついで密栓または溶閉することによっても本発明の薬品を得ることができる。さらに、凍結乾燥を行うにあたっては、湿度、温度、および大気中の酸素による生存能・生殖能の劣化をできるだけ抑えるため、種々の補助剤、分散剤、保護剤、担体などの添加剤を投与すればよい。本発明の薬品の凍結乾燥方法は、不凍蛋白質を有効成分として上記の薬品に使用することに特徴を有している。その結果、薬品の成分を分解させることなく、安定性を増大させ、かつ凍結乾燥の加熱による夾雑ウイルスを不活性化し、その感染性を除く効果をも奏し、医療、臨床分野かつ研究分野において有用な薬品である。

【0013】本発明の蛋白質は、本発明の不凍蛋白質を内在、含有、および結合などしてなる蛋白質である。本発明の蛋白質は、蛋白質または蛋白質の断片ないしは化学的修飾を受けた蛋白質であり、血漿由来蛋白質、他の組織由来蛋白質、遺伝子組み換えや組織培養によって得られた蛋白質などが挙げられ、特に限定されるものではない。蛋白質として、例えば、抗体、免疫毒素などの抗体融合蛋白質、酵素、およびエリスロポエチン、ソマトスタチン、インスリン、サイトカイン類、インターフェロン類またはプラスミノゲン活性化因子などの蛋白質ホルモンなどが挙げられる。ここで蛋白質組成物についても含有され、例えば、血漿または組織抽出液、血漿または組織抽出液を各種分画法により処理して得た画分からなる溶液、遺伝子組換え宿主または組織の培養により得られる培養液、市販の蛋白質などが挙げられ、特に制限されない。さらには、界面活性剤、蛋白質安定化剤、プロテアーゼ阻害剤を添加して使用してもよい。本発明の蛋白質の凍結乾燥方法は、不凍蛋白質を有効成分として上記の蛋白質に使用することに特徴を有している。

【0014】本発明の細胞は、本発明の不凍蛋白質を内在、含有、および接触などしてなる細胞である。例えば、生物などの原核細胞、あるいは動物や植物などの真核細胞を挙げられる。微生物の属種は特に制限されるものではなく、サッカロマイセス（*Saccharomyces*）、ハンセンラ（*Hansenula*）、キャンディダ（*Candida*）、ミクロコッカス（*Micrococcus*）、スタフィロコッカス（*Staphylococcus*）、ストレプトコッカス（*Streptococcus*）、ロイコノストア（*Leuconostoc*）、ラクトバチルス（*Lactobacillus*）、コリネバクテリウム（*Corynebacterium*）、アルスロバクター（*Arthrobacter*）、バチルス（*Bacillus*）、クロストリジウム（*Clostridium*）、ノルカルディア（*Norcardia*）、ロドコッカス（*Rhodococcus*）

us)、ロドスピリリウム・ルブラム (*Rhodospirillum rubrum*)、ナイセリア (*Neisseria*)、エシエリシア (*Escherichia*)、エンテロバクター (*Enterobacter*)、セラチア (*Serratia*)、アクロモバクター (*Achromobacter*)、アエロモナス (*Aeromonas*)、アルカリゲネス (*Alcaligenes*)、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*)、アセトバクター (*Acetobacter*)、モラクセラ (*Moraxella*)、ニトロソモナス (*Nitrosomonas*)、ニトロバクター (*Nitrobacter*)、チオパチルス (*Thiobacillus*)、グルコノバクター (*Gluconobacter*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、キサントモナス (*Xanthomonas*)、バークホルデリア (*Burkholderia*)、などの細菌、糸状菌、酵母などが挙げられる。シネココッカス *sp* (*Synechococcus sp*)、アナバエナ (*Anabaena*) などの藻類、更には原生動物、赤血球、白血球、腫瘍細胞、培養細胞、動植物細胞などの各種細胞を挙げることができる。動物細胞に関しては、例えば、骨髄液 (造血幹細胞)、繊維芽細胞、腎臓細胞、皮膚細胞のなどが挙げられる。本発明の細胞の凍結乾燥方法は、不凍蛋白質を有効成分として上記の細胞に使用することに特徴を有している。細胞を培地で増殖させ、増殖後の細胞培養液、細胞を集めた後に細胞培養液、または細胞のみを凍結乾燥する。凍結乾燥する際には、安定化剤、緩衝剤などを適宜添加することができる。本発明の不凍蛋白質を用いることで、凍結乾燥時の浸透圧の均等化、表結晶の成長防止効果を有し、細胞膜、細胞壁などの保護について効果を奏し、有用な細胞の凍結乾燥品が提供可能である。

【0015】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明は、以下の実施例によって限定されるものではない。

【実施例1】10mgのType I 不凍蛋白質 (Canada AFP Inc.社製)と2gの寒天末 (1級試薬 ナカライテック (株) 社製)を100mlの蒸留水に溶かし、温めて十分に溶解させた。プラスチックトレーに充填し、常温で冷やして固まらせ、縦25mm、横45mm、高さ12mmの寒天ゲルを得た。コントロールとしては、不凍蛋白質を含まない寒天ゲルを作成した。金属板上に等間隔に並べ、マイナス30℃の冷媒上に1時間置き冷凍した。真空度1 torrで2~3日間凍結乾燥を行い、凍結乾燥寒天を得た。これについて、20代の女性パネラー5人による官能検査を行った。

【0016】凍結乾燥寒天の評価に関する官能試験は、本発明の上記の凍結乾燥方法で製造された寒天とコントロール寒天を使用して行った。試験項目は、色調、外観、食味、におい、歯ごたえ、後味、風味について行った。その結果、コントロール寒天の外観は粗く寒天組織が見られ、ばりばりと崩れるような歯ごたえであった。

不凍蛋白質を添加した凍結乾燥寒天は、組織が細かく、コントロール寒天に比べてしなやかで弾力性があり、食味、風味とも総合的にとても良好な凍結乾燥品であるとの結果が示された。

【0017】

【実施例2】市販の馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) を洗浄し、皮をむいてから1.5cm四方の大きさに切った。0.2mg/mlのType I 不凍蛋白質 (Canada AFP Inc.社製) 溶液20mlにて5分間煮沸によるブランチングを行った後、ブランチング処理した馬鈴薯を、あらためて同濃度の不凍蛋白質溶液に移し、4℃の該溶液中で5時間浸漬した。コントロールとしては、不凍蛋白質の代わりに蒸留水を用いた。該馬鈴薯の水分を軽く拭き取った後、金属板上に等間隔に並べ、業務用冷凍冷蔵庫 (三洋電機株式会社製 SRR-MV1883C4) でマイナス20℃、12時間冷凍保存した。その後、真空度1 torrで24時間凍結乾燥を行い、凍結乾燥品の馬鈴薯を得た。

【0018】本発明による冷凍方法で凍結乾燥した馬鈴薯と、コントロールの馬鈴薯の硬さを比較した。硬度の測定は、直径20mmの円柱形ブランジャを取り付けた食感分析計 (英弘精機株式会社製 TA-XT2) を使用して、試料台上昇速度12 (cm/分)、DISTANCE 80%の測定条件で行ったものである。また、測定の試行回数は、それぞれ5回行い、表1には、上記各馬鈴薯の硬度の平均値を示した。その結果、コントロールの馬鈴薯は、組織が脆くなり崩れやすかった。不凍蛋白質を使用した本発明の凍結乾燥馬鈴薯は、組織がよりしかりとしており硬かった。食感分析計による測定値からも、不凍蛋白質を使用することによる組織の保護効果が確認できた。

【0019】

【表1】

	硬さ (N.s)
コントロール	238
不凍蛋白質	270

【0020】

【実施例3】市販の野菜である蕪 (*Brassica rapa*)、筍 (*Phyllostachys pubescens*)、馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*)、金時人参 (*Daucus carota*)、マッシュルーム (*Agaricus bisporus*) を、各々1.3cm四方の大きさに切った。90℃の湯で60分間ブランチングした後、5μg/mlのType I 不凍蛋白質 (Canada AFP Inc.社製) 溶液または25μg/mlの氷核活性細菌 (和光純薬工業株式会社製) 懸濁液20mlに4℃で浸漬し、タイテック社製の真空ポンプで1時間減圧し、内部まで液を浸透させた。コントロールとしては、20mlの蒸留水に浸漬させ減圧浸透させ

たものを用いた。水分を軽く拭き取った後、金属板上に等間隔に並べ、マイナス40℃のメタノール上に1時間置き冷凍した。真空度1 torrで2～3日間凍結乾燥を行った。

【0021】得られた凍結乾燥野菜の破断応力測定を行った。破断応力測定は、直径3mmの円柱状プランジャを取り付けたタケトモ電機株式会社製テンシプレッサー TTP-50BXを用いて、試料台上昇速度12 (cm/分)、歪率80%で圧縮する条件で行った。上記それぞれの野菜について、測定回数は10回行い、コント

10

ロールおよび不凍蛋白質添加した凍結乾燥野菜、氷核活性細菌を添加した凍結乾燥野菜について各々の破断応力の平均値を表2に示した。不凍蛋白質を添加した凍結乾燥野菜は、コントロールおよび氷核活性細菌を添加した凍結乾燥野菜に比べて各試料の組織のきめが細かく硬さが改善されており、より生の野菜に近い良好な食感を得ることができた。

【0022】

【表2】

硬さ (kg/cm ² ・cm)	蕪	馬鈴薯	金時人参
コントロール	270	366	761
不凍蛋白質	318	559	1035
氷核活性細菌	200	194	920

【0023】

【発明の効果】このように、本発明の不凍活性蛋白を用いることで、良好な食感を有する新規な凍結乾燥食品が提供できることが示された。本発明の不凍蛋白質は、食品については風味、食感が良好であり、形状を保持することが可能となり、凍結乾燥時においても食品や細胞内の水分を失う時、不凍蛋白質が細胞内に入り込んで形状を保つ働きををすると思われる。そのために凍結や凍結乾

20

燥時に不凍蛋白質を用いることにより、凍結乾燥後の色調、風味、栄養分あるいは生理活性成分などが保持されたままであり、かつ乾燥による嵩の減少防止がなされ、それらばかりかさらには品質の劣化や、形状の崩壊や吸湿などを防止することが可能となった。さらに、本発明は、生化学あるいは医学的意義が存在する分野、例えば治療薬、補充療法薬の分野において広く利用可能である。

フロントページの続き

(72)発明者 本田 通済
広島県福山市箕沖町95番地7 池田食研株式会社内

(72)発明者 佐藤 美加
広島県福山市箕沖町95番地7 池田食研株式会社内

(72)発明者 石川 愛子
広島県福山市箕沖町95番地7 池田食研株式会社内

Fターム(参考) 3L113 AC21 BA39 DA01 DA23
4B022 LA05 LJ04 LR06
4C076 AA29 EE41 GG06

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-250506

(43)Date of publication of application : 09.09.2003

(51)Int.Cl. A23L 3/42

A23L 3/44

A61K 9/19

A61K 47/42

F26B 5/06

(21)Application number : 2002-057939 (71)Applicant : IKEDA SHOKKEN KK

(22)Date of filing : 04.03.2002 (72)Inventor : OBATA HITOSHI
KAWAHARA HIDEHISA
KOMURA KEIGO
HONDA MICHINARI
SATO MIKA
ISHIKAWA AIKO

(54) FREEZE-DRYING METHOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for lyophilizing a material containing unfreezable protein, and to provide the lyophilized product.

SOLUTION: This method is to lyophilize the material containing the unfreezable protein. Because the lyophilized product is obtained by using the unfreezable protein and by lyophilization treatment, the product keeps color, flavor, nutriments or physiologically active components of the material after the material is lyophilized,

prevents decrease in bulkiness caused by the lyophilization, and further, deterioration of quality, collapse of shape, moisture absorption, or the like, are inhibited. The dried material having activity of the unfreezable protein includes food, plants, pharmaceuticals, proteins, and cells. Therefore, the method is applicable not only to a field of the food but also to various fields where biochemical and medical significances exist, such as fields of therapeutic and supplementary therapeutic agents.

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1]A freeze drying process of a dry matter which contains non-***** and is characterized by things.

[Claim 2]A freeze drying process of a dry matter characterized by freeze-drying these goods after carrying out a process which makes non-***** inherent in a dry matter.

[Claim 3]A freeze drying process of claim 1, wherein a dry matter is foodstuffs, vegetation, medicine, protein, or a cell at least – a dry matter given in 2 any 1 paragraphs.

[Claim 4]A freeze drying process of claim 1 – a dry matter given in 3 any 1 paragraphs whose non-***** is vegetation, a fish, an insect, or from microorganism at least.

[Claim 5]A freeze-drying thing which contains non-***** and is characterized by things.

[Claim 6]Freeze dried foods which contain non-***** and are characterized by things.

[Claim 7]A freeze-drying thing of claim 5-6, wherein a moisture content is 15% or less

given in any 1 paragraph.

[Claim 8]A protecting agent for freeze-drying which contains non-***** and is characterized by things.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention]This invention relates to the freeze drying process and the freeze-drying thing obtained of the dry matter containing non-***** about a freeze drying process. After making non-***** inherent in foodstuffs, vegetation, a cell, etc., it is related with offer of the method of freeze-drying. It is related with the protecting agent for freeze-drying which contains non-***** and is made into an active principle.

[0002]

[Description of the Prior Art]Freeze-drying art is used as a leading method for saving medicine or viable cells, such as a crude drug, saving foodstuffs, such as vegetables, a marine product, meat, conventionally, without degrading a color, flavor, and a nutrient as much as possible, or avoiding loss and destruction of a pharmacology ingredient and a biogenic substance. In order to make it dry without applying heat, a color, flavor, the quality of taste, a nutrient, physiologically active components, etc. are held, and also since ** of freeze-drying does not decrease by desiccation, it has the feature that it is good-looking.

Various use is made.

However, the ice crystal usually produced in the stage which freeze-drying is made to freeze beforehand before **** grows during freezing, preservation, or freeze-drying, and invites destruction of ice crystal size to the organization of a freeze-drying article. The actual condition is that this causes the badness of the fall of the hardness of a freeze-drying article, brittleness, and appearance, do not stop original description compared with processing before, and the effect expected is not acquired. The method of adding sugars, such as glucose, a shook sirloin, glycerol, and trehalose, was used in order to prevent this. However, cannot say that these methods are also enough as the quality of a freeze-drying article, but the moisture in the increase in the sweet taste by adding in large quantities, foaming under freeze-drying, and the air after freeze-drying is absorbed moisture, It leads to the quality of a freeze-drying

thing, or degradation of a function, and it is almost impossible to actually use it and it has been a big problem.

[0003]“Antifreeze active material” is known as non-***** which vegetation, fishes, an insect, etc. produce. This non-***** recognizes an icy crystal surface, sticks to the ice crystal surface, and controls growth of an ice crystal, namely, prevents the recrystallization of cryopreservation or the ice under defrosting as much as possible. It is the protein in which having a fall operation of the freezing point of water is known. Therefore, application of the usefulness in frost damage prevention of the breeding and extermination, upgrading of frozen foods, preservation of a cell and tissue, use by low-temperature operation, etc. being pointed out, and non-***** being beforehand immersed in the meat to popsicles, such as ice cream, which is addition(U.S. Pat. No. 472500)-reported and is preserved in frozen storage is expected. These are supposed that it has the effect of suppressing improvement of the taste done so from growth of the ice crystal produced when freezing, and generating of the drip produced after defrosting. However, this non-***** was used for the freeze-drying article, and it was not known about obtaining a freeze-drying thing with effects, such as new mouthfeel, until now.

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]This invention provides the method that quality, such as hardness and shape, can be held, without having inquired in view of the problem in above-mentioned conventional technology, and impairing the original quality of taste and flavor of foodstuffs in freeze-drying. Let it be a technical problem for this invention to make eating habits rich by controlling growth of the ice crystal by frozen processing, and preventing destruction of a foodstuffs organization, such as a cell membrane and a cell wall, again, and providing the new freeze-drying article which has a good texture after freeze-drying.

[0005]

[Means for Solving the Problem]Since this invention persons provide a freeze drying process of a very effective and effective dry matter that an aforementioned problem with difficult solution should be solved, As a result of inquiring wholeheartedly, by containing non-***** and freeze-drying paying attention to non-*****, it was efficient and a method of drying a dry matter for quality stably was found out. By carrying out lyophilization treatment of the non-***** of this invention using a protecting agent for freeze-drying made into an active principle, quality also found out that a good and new freeze-drying thing could be provided.

[0006]This invention can be provided also about an obtained dry article about a

method of freeze-drying a dry matter containing non-*****. That is, after making it inherent by making non-***** incorporate into a dry matter containing foodstuffs, vegetation, medicine, protein, a cell, etc., or making it permeate etc., a method of carrying out lyophilization treatment of this dry matter is provided, and an obtained freeze-drying thing is provided further. A moisture content dries a dry matter with which a moisture content is 15% or less, and a freeze-drying thing of this invention is inherent in another side in non-***** to 15% or less. A protecting agent for freeze-drying which contains non-***** as an active principle can be provided by this invention.

[0007]It is known that non-***** of this invention exists in a fish which lives in cold seawater, vegetation, etc. variously, A relative molecular weight (Mr) is the non-** polypeptide (AFP) of about 3,300–140,000, and Mr also contains glycoprotein (non-***** or AFGP) of about 2,500 to 34,000 range. Ananthanarayanan et al. (Life Chemistry Reports 7:1–32 (1989)), Non-***** is described by DeVries et al. (Ann.Rey.Physiol.45:245–260 (1983)), Davies et al. (FASEB j.4:2460–2468), Warren and others (U.S. Pat. No. 5118792). Now, non-***** from which several kinds differ is checked from various chilled water fish. For example, AFP (I-beam) is rich in an alanine (alpha-helix polypeptide), and exists in a flounder or a sculpin. AFP (II type) is rich in half cystine, and exists in Hemitripterus villosus, a herring, or a fish of Osmeridae. AFP (III type) exists in several sorts of departments of ZOARUKOIDO in which globular protein contains milk vetch and Anarhichas orientalis. Non-***** seen by a south pole fish and north-south two-poles Tara has become repeatedly [tripeptide / which mainly contains a disaccharide combined with threonyl residue] (Ala-Ala-Thr). Although AFP differs from AFGP on structure, the capability to prevent cryohydrate growth is common by combining with the ice surface. AFP and AFGP are isolated from a blood serum now, and the DNA sequence is guessed by cDNA cloning from liver. All the protein indicated by the present is compounded as big precursor polypeptide containing transit peptide in which a role of secretion of polypeptide is shown. Even if non-***** of this invention is an extract containing AFP and AFGP, they may be thing independence by which isolation refining was carried out at each, or those mixtures. When water solubility is searched for at the time of use, it is good to use water-soluble desirable high AFP (II type) or AFP (III type). As long as non-***** of this invention is a case where use the vegetable origin, the fish origin, the insect origin, and from microorganism at least, and independent one sort or it applies to vegetation which may be used combining them and used for uses other than foodstuffs, it may be non-***** produced by a

genetically modified organism. ***** of a manufacturing method of non-***** is good for a usual method of extracting and refining from a living thing. [0008] An addition of non-***** of this invention can be used as a proper range according to an ingredient etc. of a cryoprotective agent containing a gestalt, a size, a kind, character, freeze-drying conditions, immersion conditions, and this non-***** of a dry matter to apply. converting into a dry solid generally — this weight — it is 0.001 to 50% preferably 90% or less. For example, it is 10 or less % of the weight to 100 % of the weight of foodstuffs (name: a potato, size: 15x15x15mm). It is 1 or less % of the weight preferably, and is 0.0001 to 1.0 % of the weight more desirably. A protecting agent for freeze-drying containing non-***** contains non-***** at least, and from the above-mentioned addition, this non-***** computes concentration and should just use it. It is preferred to contain inhibitor of protease activity as an accessory constituent. When using for freeze-drying of a dry matter containing a substance which has protease activity, after deactivating the protease activity of a dry matter, it may freeze-dry, and it is the conditions that this protease does not act, such as pH, non-***** may be made inherent, and it may freeze-dry.

[0009] Freeze-drying of this invention contains a dry matter in which non-***** was made inherent also about a drying process by vacuum freezing, a drying process heat-treated after refrigeration, and a drying process which carried out dehydrating treatment after refrigeration. For example, what is necessary is to freeze a dry matter which was inherent in non-*****, and to process under decompression of 2 – 0.5 torr preferably, and for evaporation just to remove about 10 or less torr of moisture in a case where it is based on a freeze-drying method. It may freeze-dry, after carrying out preliminary refrigeration with temperature or a freezing point which is not frozen when freeze-drying this invention. A method and conditions of freeze-drying should just follow a usual method and conditions, and are not limited in particular. For example, after carrying out preliminary freezing of the dry matter at 0—40 **, a method of enclosing in a vacuum chamber (absolute pressure is 0.5 or less torr) below the freezing point, making it go up to about 45–50 ** of temperature of goods, and carrying out further 120 – 180-minute desiccation at this temperature may be used. Furthermore, after freezing freeze-drying of this invention, its dry **** is good, a drying method in particular after refrigeration may not be limited, and can apply various kinds of methods, such as solar drying, a hot wind or cold blast desiccation, and infrared heat desiccation, and a pressure of atmosphere at the time of desiccation may also be under decompression also in atmospheric pressure. It is related also with

an extraction method of an ingredient in a dry matter which used a freeze drying process of this invention. A moisture content of a freeze-drying thing obtained by this invention is 5% or less more preferably 10% or less 15% or less.

[0010] Foodstuffs of this invention, vegetation, medicine, protein, a cell, etc. are explained. With a substance of this invention, foodstuffs, vegetation, medicine, protein, a cell, etc. are contained at least, and it may be used combining those kind independent or them. In this invention, these substances are a dry matter of freeze-drying, its preforming thing, and a freeze-drying thing that is the final product, and contain a protecting agent for freeze-drying containing non-***** of this invention, or non-***** of this invention. Foodstuffs of this invention are foodstuffs in which immanency, content, etc. carry out non-***** of this invention. For example, a tomato, an onion, a ginseng, a Japanese radish, a potato, a burdock, A Japanese pumpkin, a green pepper, a cabbage, a cauliflower, asparagus, okra, Vegetables, such as a Welsh onion, a cucumber, a Japanese pumpkin, an eggplant, a watermelon, a spinach, and a cauliflower, Grain, such as beans, a strawberry, a persimmon, an apple, lemon, a cherry, a pear, a peach, Fruit, such as a blueberry and a melon, nuts and seeds, a salmon, a sea bream, flatfishes, *****, Processed goods, such as seasonings, such as fancy drinks, such as fish and shellfishes, such as a shrimp and *****, birds-and-beasts meat, eggs, milk, mushrooms, algae, confectionary, taste alcohol, and tea, and sauce, spices and tofu, konnyaku, and agar, are mentioned, or processing of boiling cooking etc. and cooked foodstuffs are also contained in these. A gestalt like snack confectionery which may return with water freeze dried foods obtained by this invention, may eat them, and does not return to water, but eats as it is may be sufficient. It can also eat in the state of powder. This powder can be processed into a tablet, a sugar-coated tablet, and granularity, for example, it can also be used as the inside of a raw material of various foodstuffs, such as powder seasonings, such as bread and cakes, bean paste, tofu, a candy, yogurt, fish flour, powdered broth, base of soup, and powdered soy sauce, and nutrition maintenance foodstuffs. A freeze drying process of foodstuffs of this invention has the feature to make it contain in the above-mentioned foodstuffs by making non-***** into an active principle. As a result, new freeze dried foods with good mouthfeel can be provided.

[0011] Vegetation of this invention is vegetation which immanency, content, contact, etc. make non-***** of this invention. For example, all the vegetation and these crops, such as *****, vegetables, a flowering plant, a fruit tree, and fruits, are meant. A seedling and a seed are also included by vegetation. For example, all the useful plants,

such as vegetation of flowering plants grown in a field, such as a vegetable seedling, a carnation and Delphinium, a sweet pea, Gypsophila elegans, a lily, a freesia, a tulip, a ** run, a flower of a chrysanthemum, a flower of a cherry tree, and rape blossoms, and vegetation of flowering plants transplanted to a bowl, can be mentioned. It is applicable also to cut flowers which separate a root and are made in pars intermedia of a plant stem of flowering plants, and a place of a lower end part, and an end leaf. A vegetable freeze drying process using non-***** of this invention is related with a method which excelled for holding vegetable freshness. A vegetable freeze drying process using non-***** of this invention as a cryoprotective agent, After performing blanching, such as immersion and spraying, in a boil solution (pH 6-11) which immersion, spraying, spreading, etc. are contacted in a solution in which non-***** contains vegetation, or non-***** contains, again, it contacts and non-***** is freeze-dried. For example, what is necessary is just to freeze-dry after being immersed in a solution containing non-***** after spraying a boil solution which contains non-***** in a rear surface of a petal, when freeze-drying a petal. A freeze drying process of vegetation of this invention has the feature to give the above-mentioned vegetation by making non-***** into an active principle. As a result, flowers can be saved at a long period of time, and a color tone at the time of harvest can be held further, an original fresh state can be maintained, excessive withering or deterioration cannot be caused, and it can provide for a commercial scene. What is necessary is to use non-***** at the time of cultivation of vegetation, and just to freeze-dry as an exception method, after making harvested vegetation inherent in vegetation which had remaining as it is or non-***** harvested.

[0012]Medicine of this invention is a medicine with which immanency, content, combination, etc. carry out non-***** of this invention. A protein product, an experimental material, and a reagent for research with which medicine of this invention consists of drugs, a blood product, pharmacological activity protein, and pharmacological activity polypeptides are mentioned. In order to manufacture medicine of this invention, medicine and non-***** of this invention are dissolved in buffer solution, such as water of an adequate amount or a phosphate buffer solution, acetic acid buffer solution, and boric acid buffer solution, if needed, pH is adjusted to an optimum field of non-***** , and sterile filtration is carried out. After pouring filtrate distributively in containers, such as a vial or an ampul, and freeze-drying with a conventional method subsequently, medicine including pharmaceutical preparation of this invention can be manufactured by sealing or *(ing). Medicine of this invention

can be obtained also by pouring distributively powder obtained by freeze-drying the above-mentioned filtrate in the above-mentioned container, and subsequently sealing or ****(ing) it. What is necessary is just to prescribe additive agents, such as various adjuvants, a dispersing agent, a protecting agent, and a carrier, for the patient, in order to suppress degradation of humidity, temperature, and viability and reproductive potential by oxygen in the atmosphere as much as possible, if in charge of freeze-drying. A freeze drying process of medicine of this invention has the feature to use it for the above-mentioned medicine by making non-***** into an active principle. As a result, without making an ingredient of medicine decompose, stability is increased, and a contamination virus by heating of freeze-drying is inactivated, an effect except the infectiosity is also done so, and it is a useful medicine in medical science, a clinical field, and an area of research.

[0013]Protein of this invention is protein in which immanency, content, combination, etc. carry out non-***** of this invention. It is the protein which received a fragment or chemical modification of protein or protein, plasma origin protein, other organization origin protein, protein obtained by transgenics or a tissue culture, etc. are mentioned, and protein of this invention is not limited in particular. As protein, protein hormone, such as antibody fusion proteins, such as an antibody and immunotoxin, an enzyme and erythropoietin, somatostatin, an insulin, cytokine, interferon, or a plasminogen activator, etc. are mentioned, for example. It contains also about a protein composition thing here, for example, culture medium obtained by culture of a solution which consists of a fraction which obtained plasma or a tissue extract, plasma, or a tissue extract by processing it by various fractionation methods, a gene recombination host, or an organization, commercial protein, etc. are mentioned, and it is not restricted in particular. A surface-active agent, a protein stabilizing agent, and a protease inhibitor may be added and used. A freeze drying process of protein of this invention has the feature to use it for the above-mentioned protein by making non-***** into an active principle.

[0014]A cell of this invention is a cell which immanency, content, contact, etc. make non-***** of this invention. For example, eukaryotic cells, such as prokaryotic cells, such as a living thing, or an animal, and vegetation, can be mentioned. A species in particular of a microorganism is not restricted and Saccharomyces (Saccharomyces), Hansenula (Hansenula), Candida (Candida), Micrococcus (Micrococcus), Staphylococcus (Staphylococcus), Streptococcus (Streptococcus), a ROIKONO store (Leuconostoa), Lactobacillus (Lactobacillus), Corynebacterium (Corynebacterium), Arthrobacter (Arthrobacter), a bacillus (Bacillus), Clostridium

(Clostridium), NORUKARUDIA (Norcardia), Rhodococcus (Rhodococcus), Rodhospyrylium RUBURAMU (Rhodospirillum rubrum), Neisseria (Neisseria), ESHIERISHIA (Escherichia), Enterobacter (Enterobacter), Serratia (Serratia), achromobacter (Achromobacter), Aeromonas (Aeromonas), Alcaligenes (Alcaligenes), Flavobacterium (Flavobacterium), the acetobacter (Acetobacter), Moraxella (Moraxella), Nitrosomonas (Nitrosomonas), Nitrobacter (Nitrobacter), Thiobacillus (Thiobacillus), Bacteria, such as Gluconobacter (Gluconobacter), Pseudomonas (Pseudomonas), xanthomonas (Xanthomonas), and bark HORUDERIA (Burkholderia), a filamentous bacterium, yeast, etc. are mentioned. SHINEKOKOKKASU Various cells, such as algae, such as sp (Synechococcus sp) and ANABAENA (Anabaena), and also protozoa, red corpuscles, leucocytes, tumor cells, a cultured cell, and an animals-and-plants cell, can be mentioned. About an animal cell, bone marrow fluid (hematopoietic stem cell), fibrocyte, a kidney cell, skin cells, etc. are mentioned, for example. A freeze drying process of a cell of this invention has the feature to use it for the above-mentioned cell by making non-***** into an active principle. A cell is proliferated by a culture medium, and after collecting cell culture fluid after growth, and cells, only cell culture fluid or a cell is freeze-dried. When freeze-drying, a stabilizing agent, a buffer, etc. can be added suitably. By using non-***** of this invention, it has an equation of osmotic pressure at the time of freeze-drying, and a front crystal growth preventive effect, effect can be taken about protection of a cell membrane, a cell wall, etc., and a freeze-drying article of a useful cell can be provided.

[0015]

[Example] Hereafter, this invention is not limited by the following examples although an example explains this invention concretely.

[Example 1] 10-mg Type I Non-***** (made by a Canada AFP Inc. company) and 2 g of agar pulveratum (made by extra-pure-reagent NAKARAI Tech company) were melted and warmed to 100 ml of distilled water, and were fully dissolved in it. Filled up the plastic tray, it was made to cool and solidify at ordinary temperature, and 25 mm long, 45 mm wide, and 12-mm-high agar gel were obtained. The agar gel which does not contain non-***** was created as control. It arranged at equal intervals on the metal plate, and froze every other hour on the minus 30 ** refrigerant. Freeze-drying was performed for two to three days by degree-of-vacuum 1 torr, and freeze-drying agar was obtained. About this, the organoleptic test by five female panelists in their twenties was conducted.

[0016] The organoleptics about evaluation of freeze-drying agar were done using the agar manufactured with the above-mentioned freeze drying process of this invention,

and control agar. The test item followed a color tone, appearance, a flavor, a smell, resistance to the teeth, aftertaste, and flavor. As a result, the appearance of control agar was the resistance to the teeth which gelatinous tissue is seen coarsely and collapses very hard. An organization is fine, and the freeze-drying agar which added non-***** has it compared with control agar, and is elastic, and the result that a flavor and flavor were synthetic very good freeze-drying articles was shown. [pliant] [0017]

[Example 2] The commercial potato (*Solanum tuberosum*) was washed, and after stripping off the hide, it cut in the size of 1.5 cm around. 0.2mg/ml Type I After 20 ml of non-***** (made by CanadaAFPInc. company) solutions performed blanching by boiling for 5 minutes, the potato which carried out blanching treatment was anew moved into non-***** of the concentration, and was immersed in this 4 ** solution for 5 hours. As control, distilled water was used instead of non-*****. arranging at equal intervals on a metal plate, after wiping off the moisture of this potato lightly -- a business-use freezing refrigerator (SANYO Electric Co., Ltd. make SRR-muV1883C4) -- minus 20** -- it preserved in frozen storage for 12 hours. Then, freeze-drying was performed by degree-of-vacuum 1 torr for 24 hours, and the potato of the freeze-drying article was obtained.

[0018]The hardness of the potato freeze-dried with the freezing method by this invention and the potato of control was compared. The mouthfeel analyzer (TA-XT2 by Hidehiro energy machine incorporated company) furnished with a cylindrical plunger 20 mm in diameter is used, and measurement of hardness is performed by the sample table climbing speed 12 (a part for cm/), and DISTANCE 80% of measuring condition. Trial frequency of measurement was performed 5 times, respectively, and showed the average value of the hardness of each above-mentioned potato in Table 1. As a result, an organization becomes weak and the potato of control collapsed easily. The organization was more solid and the freeze-drying potato of this invention which uses non-***** had it. [hard] Also from the measured value by a mouthfeel analyzer, the protective effect of the organization by using non-***** has been checked.

[0019]

[Table 1]

	硬さ (N.s)
コントロール	238
不凍蛋白質	270

[0020]

[Example 3] The turnip (*Brassica rapa*), bamboo shoot (*Phyllostachys pubescens*) which are commercial vegetables, The potato (*Solanum tuberosum*), the Kintoki carrot (*Daucus carota*), and the mushroom (*Agaricus bisporus*) were respectively cut in the size of 1.3 cm around. 5 microg/ml Type I after carrying out blanching for 60 minutes with 90 °C hot water. It is immersed in a non-***** (made by Canada AFP Inc. company) solution, or 20 ml of 25 microg/ml ice-nucleus activity bacteria (made by Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) suspension at 4 °C. It decompressed with the Tietech vacuum pump for 1 hour, and liquid was made to permeate to an inside. As control, what made 20 ml of distilled water immerse, and carried out decompression osmosis was used. After wiping off moisture lightly, it arranged at equal intervals on the metal plate, and froze every other hour on minus 40 °C methanol. Freeze-drying was performed for two to three days by degree-of-vacuum 1 torr.

[0021] Rupture stress measurement of the obtained freeze-drying vegetables was performed. TENSHI presser by TAKETOMO electrical machinery incorporated company with which rupture stress measurement attached a cylindrical plunger 3 mm in diameter. It carried out using TTP-50BX on the conditions compressed by the sample table climbing speed 12 (a part for cm/), and 80% of a distortion rate. About the vegetables of each above, the measurement count was performed 10 times, and the average value of each rupture stress was shown in Table 2 about the freeze-drying vegetables which controlled and added [non-*****], and the freeze-drying vegetables which added ice-nucleus activity bacteria. Compared with the freeze-drying vegetables in which the freeze-drying vegetables which added non-***** added control and ice-nucleus activity bacteria, it is [of the organization of each sample] fine and hardness is improved. Good mouthfeel near more nearly raw vegetables was able to be obtained.

[0022]

[Table 2]

硬さ (kg/cm ² ・cm)	筍	馬鈴薯	金時人参
コントロール	270	366	761
不凍蛋白質	318	559	1035
氷核活性細菌	200	194	920

[0023]

[Effect of the Invention] Thus, it was shown that the new freeze dried foods which have good mouthfeel can be provided by using the anti-freeze activity protein of this invention. It seems that non-***** of this invention serves for non-***** to enter into intracellular and to maintain shape at when it becomes flavor and mouthfeel are good about foodstuffs and possible to hold shape and foodstuffs and intracellular moisture are lost at the time of freeze-drying. By using non-***** at the time of freezing or freeze-drying, therefore, the color tone after freeze-drying, Flavor, a nutrient, physiologically active components, etc. are held, and Takashi's prevention from reduction by desiccation was made, and it became possible only in about them to prevent degradation of quality, collapse of shape, moisture absorption, etc. to umbrellas. This invention is widely available in the field of the field in which biochemistry or medical significance exists, for example, a remedy, and substitution therapy medicine.

[Translation done.]